

## 5 DISKUSSION

Mikrogliazellen sind hochreaktive, mobile und multifunktionelle Zellen des zentralen Nervensystems, die sowohl im gesunden als auch im erkrankten Gehirn eine wichtige Rolle einnehmen (NAKAJIMA AND KOHSAKA, 1998). Die vom Mesoderm abstammenden Zellen infiltrieren während der embryonalen und frühen postnatalen Phase das ZNS und konvertieren dort in ramifizierte residente Mikroglia (RAIVICH et al., 1999). Dieser deaktivierte Phänotyp ist an die spezielle Mikroumgebung des ZNS angepaßt und scheint eine Wachfunktion im ZNS einzunehmen (KREUZBERG, 1996; PASTI et al., 1997; CICCARELLI et al., 2000; BANATI, 2003; HANSSON & RÖNNBÄCK, 2003). Bei kleinsten Veränderungen der Mikroumgebung können Mikrogliazellen aktiviert werden und sich zu intrinsischen Gehirnmakrophagen und damit zu immunkompetenten Zellen differenzieren. Der Prozeß der Mikrogliaaktivierung beinhaltet dabei ein typisches Muster, bestehend aus morphologischen Veränderungen, Proliferation, Freisetzung bestimmter Mediatoren und zytotoxischer Substanzen, Migration zu den Orten neuronaler Aktivität, Expression immunologisch relevanter Oberflächenproteine und Phagozytose geschädigter Neurone (BANATI et al. 1993a; KREUZBERG, 1996, BENVENISTE, 1997; ALOISI, 2001). Viele Forschungsarbeiten belegen, daß Mikrogliazellen eine Schlüsselrolle in allen wichtigen neuroinflammatorischen Erkrankungen des ZNS einnehmen und erheblich durch die Bildung zytotoxischer Substanzen an der Sekundärschädigung von Hirngewebe beteiligt sind (MCGEER & MCGEER, 1998; CALABRESE et al., 2000; EMSLEY & TYRRELL, 2002; HALLIDAY et al., 2000; GEBICKE-HAERTER, 2001; CARSON, 2002; MORGANTI-KOSSMANN et al., 2002). Ein besseres Verständnis der Regulierung mikroglialer Aktivierungsprozesse kann deshalb als wichtige Grundlage für die Prävention und Therapie neuropathologischer Erkrankungen angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit bildeten Untersuchungen über die mikroglialen Aktivierungsmechanismen nach exzitotoxischer Schädigung von lebendem hippocampalen Gewebe, sowie die Suche nach Faktoren, die in diese Aktivierungskaskade inhibierend eingreifen könnten, den Schwerpunkt. Dabei wurde auf die Rolle des nukleären Enzyms Poly(ADP-ribose)-Polymerase bei der Mikrogliaaktivierung nach exzitotoxischer Hirnschädigung fokussiert. Die PARP-1 katalysiert unter Abspaltung von Nikotinamid den Transfer von ADP-Ribose-Einheiten aus  $\text{NAD}^+$  auf spezifische Akzeptorproteine. Diese Poly(ADP-Ribosyl)ierungsreaktion bewirkt eine posttranslationelle Modifikation nukleärer Proteine (HA & SNYDER, 2000). Die PARP ist beispielsweise an der Regulierung wichtiger Zellkernproteine, der DNA-Reparatur, der Apoptose und der Transkriptionsregulation beteiligt (BÜRKLE, 2001; D'AMOURS et al., 1999). Weiterhin wird der Poly(ADP-Ribosyl)ierung eine zentrale Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen und bei Ischämie-Schäden im ZNS zugeschrieben (GOTO et al., 2002; ZHANG et al., 1994; ELIASSON et al., 1997; TOKIME et al., 1998). Hier kommt es als Antwort auf eine exzitotoxische Schädigung zur vermehrten Bildung zytotoxischer Substanzen und zu einer schnellen und starken Aktivierung der PARP-1 in neuronalen Zellen. Durch die Überaktivierung der PARP erfährt die Zelle einen starken Verbrauch an

NAD<sup>+</sup>(BERGER et al., 1985), was letztendlich zu einem hohen Verlust an ATP führt. Auf diese Weise entsteht ein erhebliches Energiedefizit in der neuronalen Zelle, das schließlich mit dem nekrotischen Tod der Zelle endet (ZHANG et al., 1994; ELIASSON et al., 1997). In tierexperimentellen Krankheitsmodellen konnte mehrfach gezeigt werden, daß die Inhibition der PARP-1 eine Hemmung der NMDA-Rezeptor vermittelten Glutamattoxizität bewirkt und somit einem neuronalen Zelltod entgegengewirkt werden kann (ZHANG et al., 1994). PARP-Inhibitoren sind in der Lage, sowohl die Aktivierung der PARP als auch den darauffolgenden starken Energieverlust der Zelle zu unterbinden (PLASCHKE et al., 2000). Die Anwendung von PARP-Inhibitoren gilt demnach als vielversprechende protektive Therapie, um einem akuten neuronalen Zelltod durch exzitotoxische Schädigung oder Ischämie vorzubeugen. Die PARP ist ebenso an der schnellen und effizienten DNA-Reparatur beteiligt. Sie ist dabei hochaktiv in Neuronen und stellt einen essentiellen Schutzmechanismus für neuronale Zellen dar, der es ihnen ermöglicht, mit Streßfaktoren, wie freien Radikalen und toxischen Zytokinen, wie sie von Mikrogliazellen und Makrophagen produziert werden, umzugehen (COLTON & GILBERT, 1993). Der Einsatz von unspezifischen PARP-Inhibitoren ist deshalb zwiespältig: Einerseits kann ihr Einsatz Neurone vor dem akuten exzitotoxischen Zelltod schützen, andererseits verhindern sie jedoch die Möglichkeit, daß Neurone ihre PARP-abhängigen Reparaturprogramme entwickeln können, wodurch ein späterer Sekundärschaden entstehen kann.

Therapeutische Präventionen sollten sich deshalb auf die Hemmung von Faktoren konzentrieren, die bei der Entstehung des sekundären Schadens eine Rolle spielen und nicht in das neuronale Reparaturprogramm eingreifen. Hierzu zählen unter anderem die Inhibition der Migration von Mikrogliazellen und Makrophagen zum Ort des neuronalen Schadens und die Verhinderung der Produktion toxischer Radikale und Zytokine durch eben diese Zellen. In dieser Arbeit wurde die mikrogliale PARP-1 mittels einer antisense-Strategie inhibiert. Dadurch sollte aufgeklärt werden, ob und wie die PARP-1 an der Kontrolle der Zellmigration zum Ort der neuronalen Schädigung beteiligt ist, und ob durch eine Inhibition der mikroglialen PARP-1 initial geschädigte Neurone vor einer weiteren inflammatorischen Schädigung (Sekundärschaden) geschützt werden können.

## **5.1 Methodentechnische Diskussion**

### **5.1.1 Klonierung eines antisense PARP-1- und eines antisense CD11a-Vektors**

Für die Analysen zur Mikrogliaaktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz der antisense-Strategie die PARP-1-Proteinexpression in Mikrogliazellen unterbunden, um untersuchen zu können, ob das PARP-1-Protein allein oder die aktivierte und poly(ADP-ribosyl)ierte PARP-1 am Regulationsprozeß beteiligt ist. Anwendung findet die antisense-Technik vor allem, um die Aktivität von Genen gezielt zu blockieren, um so ihre Funktion in der Zelle zu analysieren (PRUDOVSKY et al., 2002; WEINTRAUB, 1990). Das Prinzip beruht auf der Synthese eines antisense mRNA-Moleküls, das komplementär zur sense mRNA eines Zielgens ist. Der genaue Mechanismus der Inhibition ist nicht

bekannt, es bestehen jedoch theoretisch verschiedene Möglichkeiten: So wird davon ausgegangen, daß die antisense RNA das in den Zellen synthetisierte primäre RNA-Transkript zunächst komplexiert und dadurch entweder die korrekte Prozessierung, den Transport aus dem Zellkern oder die Stabilität beeinflusst. Weiterhin kann die Translation und damit die normale Genexpression durch Verhinderung der Ribosomenanlagerung gestört sein (IBELGAUFTS, 1993). Antisense RNA kann nicht nur durch experimentelle Manipulation in tierische Zellen gelangen, sondern wird auch natürlicherweise in Zellen gebildet und erfüllt dort die physiologische Aufgabe des RNA-Editings (KIMELMAN & KIRSCHNER, 1989).

Den Ausgangspunkt für die Experimente in der vorliegenden Arbeit bildete die Klonierung eines antisense PARP-1-Vektors, da die PARP-1 eine wichtige Komponente bei der NMDA-vermittelten Exzitotoxizität zu sein scheint (GOTO et al., 2002). Ein besonderer Schwerpunkt wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit auf die Rolle der PARP-1 bei der Mikrogliaaktivierung nach exzitotoxischer Hirnschädigung gelegt, da in tierexperimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mehrfach gezeigt werden konnte, daß die Inhibition der PARP-1 eine Hemmung der NMDA-Rezeptor vermittelten Glutamattoxizität bewirkt, wodurch einem neuronalen Zelltod entgegengewirkt werden kann (ZHANG et al., 1994; ELIASSON et al., 1997; TOKIME et al., 1998). Durch Einklonieren einer gegen die mRNA des zu inhibierenden Zielmoleküls gerichteten antisense-Sequenz in den vielfachen Klonierungsbereich eines pcDNA3.1(+)-Vektors sollte dabei die Expression des Zielproteins verhindert werden. Dafür wurde die entsprechende Ziel-Sequenz aus der Gesamt-RNA von BV-2 Mikrogliazellen mittels der PCR amplifiziert, elektrophoretisch getrennt, aus dem Gel eluiert und in antisense-Orientierung in den pcDNA3.1(+)-Vektor ligiert. Mit dem erhaltenen antisense-Vektor wurden kompetente E.coli Zellen transformiert und selektiert. Aus der klonalen Kolonie wurde das Plasmid isoliert, elektrophoretisch getrennt, eluiert und nachfolgend Mikrogliazellen damit transfiziert. Zuerst erfolgte die Klonierung eines antisense PARP-1-Vektors. Aufgrund der mit diesem Vektor erhaltenen Ergebnisse wurde daraufhin zu einem späteren Zeitpunkt ein antisense CD11a-pcDNA3.1(+)-Vektor hergestellt. Beide Klonierungsvektoren wurden eingesetzt, um Fragestellungen auf dem Gebiet der Regulation der Mikrogliazellaktivierung im Rahmen einer exzitotoxischen neuronalen Schädigung in lebendem Hirngewebe zu beantworten.

Für die Transfektion von Makrophagen sind verschiedene virale und nicht virale Methoden beschrieben worden. Eine gute Übersicht liefert dabei die Arbeit von Burke et al. (BURKE et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem pcDNA 3.1 (+) Vektor, einem nicht viralen Vektor, gearbeitet. Dieser Expressionsvektor wurde gewählt, da er die effiziente Expression des eingebrachten Konstruktes durch besonders starke, in ihrer Funktion optimierte Promotoren, als genetische Kontrollsequenzen gewährleistet. Das Konstrukt liefert nach der Transfektion in der Zielzelle ein stabiles Transkript, da der Vektor alle für die Prozessierung der RNA erforderlichen Signale enthält (IBELGAUFTS, 1993). Einen weiteren Vorteil bildete der Vektor durch seine Eigenschaft, sich in zwei verschiedenen Spezies zu vermehren, nämlich in den prokaryotischen E. coli Zellen und den

eukaryotischen Mikrogliazellen. Weiterhin war die Möglichkeit der Generation einer stabil transfizierten Zelllinie über das im Vektor enthaltene und in Eukaryoten wirkende Zeocinresistenzgen gegeben.

Weitere nicht virale Techniken stellen unter anderem die Oligonukleotid-Transfektion und die erst seit kurzem etablierte Methode der small interfering RNA (siRNA)-Transfektion dar. Bei der Oligonukleotid-Technik werden kurze DNA-Nukleotide in antisense-Orientierung zur mRNA des zu inhibierenden Zielproteins in die Zelle eingebracht. Diese Oligonukleotide hybridisieren mit der mRNA der Zelle und verhindern so eine Translation (VARGA et al., 1999; WEISS et al., 1997). Bei der siRNA-Technik wird eine doppelsträngige RNA (dsRNA) in die Zelle eingebracht, die dann im Zytoplasma in kleinere siRNAs gespalten wird. Diese siRNAs reagieren mit der codierenden mRNA, indem sie diese spalten. Durch diesen Vorgang wird ebenfalls die Translation des Zielproteins unterbunden (ELBASHIR et al., 2002; XIA et al., 2002; MCMANUS & SHARP, 2002; SONG et al., 2003). Beide Methoden sind nur für die transiente Transfektion von Zellen geeignet und stellen zytoplasmatische Vorgänge dar. Obwohl virale Transfektionsmethoden den Vorteil der hohen Transfektionseffizienz und einer längeren Expressionszeit des Transgens bieten, hat der Einsatz nicht viraler Transfektionsmethoden den Vorteil der Zeitersparnis, da die Konstruktion eines rekombinanten Virus‘ nicht benötigt wird und in kürzerer Zeit eine große Anzahl von Konstrukten auf ihre Funktionalität getestet werden kann (BURKE et al., 2002).

Die Methode der Vektortransfektion wurde anderen bereits beschriebenen nicht viralen Techniken vorgezogen, da der Effekt von *in vitro* synthetisierten RNA- oder kurzen, einzelsträngigen DNA-Molekülen kürzer ist, als der der antisense RNA-Synthese *in vivo* von in das Genom integrierten Expressionsvektoren (KOCH-BRANDT, 1993). Eine Schwierigkeit ergab sich durch die Eigenschaften der gewählten Zielzelle, da mit dem Klonierungsvektor Mikrogliazellen transfiziert werden sollten, die nach ihrer Aktivierung viele Gemeinsamkeiten mit Gewebsmakrophagen aber auch mit neutrophilen Granulozyten aufweisen (siehe Kapitel 1.2.5). Den Zellen gemeinsam ist nach ihrer Aktivierung die starke Phagozytosefähigkeit und damit verbunden ein großes Vorkommen an Lysosomen/Endosomen im Zytoplasma (GEMSA et al., 1991). Wird fremde DNA von Makrophagen ohne Transfektionsreagenz, rein durch Endozytose aufgenommen, wird diese von Nukleasen, die in den Lysosomen der Makrophagen enthalten sind, durch eine Endosom-Lysosom-Fusion abgebaut (NAGATA et al., 1983). So besteht bei phagozytosefähigen Zellen generell eine größere Möglichkeit, daß die eingebrachten Sequenzen von der Zelle als fremd erkannt werden, in den Endosomen im Zytoplasma aufgenommen und von Nukleasen gespalten werden, wodurch sie ihre Wirkung nicht mehr entfalten können (BENNET et al., 1985). Bei der Vektor-Strategie wird der Vektor in das Genom integriert (STACEY et al., 1996), die antisense RNA erst im Nukleus gebildet und dann ausgeschleust. Zwar besteht auch hier nach dem Austritt aus dem Kern die Möglichkeit eines Abbaus der antisense RNA durch Aufnahme in Lysosomen/Endosomen, da jedoch die Funktionsweise der antisense-Strategie theoretisch auf mehreren Ebenen stattfinden kann, wie beispielsweise durch Behinderung der

korrekten Prozessierung des primären RNA-Transkripts oder auch der Behinderung des Transports aus dem Zellkern, sind hier noch Varianten der „präzytosolischen“ Hemmung möglich, die eine Inhibierung ohne vorzeitigen Abbau ermöglichen.

Die einzelnen molekularbiologischen Schritte bis zum Erhalt der beiden antisense tragenden Vektoren wurde mit Hilfe von Agarose-Gelen abgesichert, um jeweils die Intaktheit der verwendeten RNA- oder DNA-Moleküle sicherzustellen. Die Vollständigkeit der cDNA wurde vor der eigentlichen Amplifizierung der beiden antisense-Konstrukte mit der  $\beta$ -Actin-PCR überprüft. Das  $\beta$ -Actin-Gen ist ein „house keeping“ Gen, das konstitutiv von der Zelle exprimiert wird. Da die  $\beta$ -Actin-Bande im Gel detektiert werden konnte, war dies ein Beweis dafür, daß die Ausgangs-RNA vollständig in eine cDNA umgeschrieben worden war. Die vollständige Ligation der antisense-Konstrukte in den für die Transfektion vorgesehenen Vektor wurde mit Agarose-Gelen überprüft und der fertige Klonierungsvektor teilsequenziert, wobei das PARP-1-Konstrukt eine 96 %ige und das CD11a-Konstrukt eine 100 %ige Übereinstimmung mit der Originalsequenz aufwies. Die Klonierungsvektoren wurden anschließend für die Transfektion von Mikrogliazellen eingesetzt.

### **5.1.2 Transfektionen von BV-2 Zellen und primärer Mikrogliazellen mit den antisense-Vektoren**

Die Transfektion der permanenten Zelllinie BV-2 und primärer Mikrogliazellen mit den antisense-Vektoren sollte dazu dienen, Informationen über das Aktivierungs- und Migrationsverhalten der Mikrogliazellen bei entsprechender Inhibierung des Enzyms PARP-1 oder des Integrins CD11a zu erhalten. Erfolgreich transfizierte Zellen wurden dafür nachfolgend für Experimente mit den organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (siehe 5.1.3) und für Zellkulturversuche (5.1.4) eingesetzt.

Die Transfektionen der Mikrogliazellen mit den entsprechenden antisense-Vektoren bildeten dabei einen kritischen Punkt in der vorliegenden Arbeit, da, wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, Mikrogliazellen ebenso wie Makrophagen nach ihrer Aktivierung ein großes Vorkommen an Lysosomen/Endosomen im Zytoplasma aufweisen, die eng mit der Phagozytosefähigkeit der Zellen verbunden sind (GEMSA et al., 1991). So besteht bei einer Transfektion von phagozytosefähigen Zellen generell die Möglichkeit, daß die eingebrachte, fremde DNA in den Lysosomen dieser Zellen aufgenommen werden kann, um dort von Nukleasen degradiert zu werden (NAGATA et al., 1983). Da weiterhin nicht genau bekannt ist, ob und wie bzw. auf welcher Ebene ein antisense-Konstrukt in einer Zelle wirkt, stellten die Transfektionsexperimente mit den antisense-Vektoren einen entscheidenden Schritt für den weiteren Ablauf dieser Arbeit dar.

Als Transfektionsreagenz wurde in der vorliegenden Arbeit Roti-Fect, eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids, zur Transfektion von BV-2 Zellen verwendet. Transfektionsreagenzien mit Lipidkomponenten (Liposomen, Lipoplexe und kationische Komponenten) bringen eine Menge Vorteile mit sich. Sie besitzen nicht nur eine geringe Zytotoxizität, sondern können auch mit einer

großen Menge an DNA Komplexe bilden und rufen, *in vivo* angewendet, keine immunologischen oder inflammatorischen Reaktionen hervor (MACK et al., 1998; DOKKA et al., 2000). BV-2 Zellen wurden zur Etablierung der Methode mit dem EGFP-Vektor, einem grün fluoreszierenden Vektor und Rotifect transfiziert, um die Wirksamkeit des Transfektionsreagenzes und die Transfektionsrate mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie zu überprüfen. Die Daten sind in dieser Arbeit nicht gezeigt und beruhen auf Vorarbeiten am Institut für Anatomie. Primäre Mikrogliazellen wurden transient mit dem pcDNA 3.1(+) Vektor oder dem pcDNA 3.1(+) Vektor, ligiert mit dem antisense PARP-1-Konstrukt, transfiziert. Aufgrund der Schwierigkeit, mit konventionellen Transfektionssystemen eine hinreichend hohe Transfektionsrate und funktionelle Expression des antisense-Konstruktes zu erzielen, wurde eine neue Transfektionsmethode eingesetzt. Eine ursprünglich für die Gentherapie entwickelte Starburst-Dendrimer-Methode, bei der große Mengen an DNA mittels untoxischer Polyamidoamine (PAMAM-Dendrimere) in Zellen eingeschleust werden, wurde dafür zunächst optimiert. In Vorversuchen konnten dabei keine unspezifischen Effekte der PAMAM-Dendrimere, bezogen auf die PARP-1-Aktivität in Mikrogliazellen, ermittelt werden. Verglichen mit der Elektroporation als Transfektionsmethode, bei der durch schwache elektrische Impulse die Zellmembran für die FremddNA durch die Bildung kleiner Poren durchlässig gemacht wird, (WEIR & MELTZER, 1993), erhält man mit der Lipidtransfektion zwar eine geringere Transfektionsrate, die Zellen bleiben jedoch überwiegend vital, während bei der Elektroporation eine hohe Zelltodrate zu beobachten ist. Diese liegt für Zelllinien, in Abhängigkeit von der verwendeten Pulsmethode, bei bis zu 60 % innerhalb von 72 Stunden nach der Elektroporation (LIAO et al., 1997; KUSUMAWATI et al., 1999) und bei bis zu 75 % bei primären Zellen innerhalb von 24 Stunden nach der Elektroporation (WEIR & MELTZER, 1993).

Nach der Transfektion wurden BV-2 Zellen für zwei Wochen mit Zeocin behandelt, um erfolgreich transfizierte Zellen von den Zellen, die den Vektor nicht integriert hatten, zu selektionieren. Mit nativen BV-2 Zellen wurde vor der Transfektion und Zeocinselektion eine Toxizitätskurve erstellt, da Zelllinien teilweise eine natürliche Resistenz gegen verschiedene Antibiotika aufweisen. Für die Selektion wurden in den Versuchen 100 µg/ml Zeocin eingesetzt. Diese Konzentration ermöglichte einerseits ein Überleben der transfizierten Zellen und bewirkte andererseits, daß nicht transfizierte Zellen abgetötet wurden. Bevor die stabil transfizierten Mikrogliazellen in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt worden waren, erfolgte die Überprüfung der Effektivität der eingebrachten antisense-Konstrukte. Getestet wurde dabei, ob eine verminderte oder fehlende Expression des zu inhibierenden Moleküls im Vergleich zu den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen, vorlag. Transfektionen mit dem Kontrollvektor wurden zusätzlich durchgeführt, um unspezifische Effekte des Leervektors auszuschließen. Der Nachweis der PARP-1-Expression an den mit dem asPARP-1-Vektor transfizierten BV-2 Zellen und den Kontrollzellen erfolgte mit der Immuno-Blotting-Technik, wobei durch die Auftrennung der Proteine die Identifikation des PARP-1-Proteins möglich wurde. Kontrollvektor-transfizierte Zellen zeigten nach der Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) eine

deutlich detektierbare PARP-1-Expression. BV-2 Zellen, die mit dem asPARP-1-Vektor transfiziert worden waren, zeigten einen Tag nach der Transfektion noch eine, im Vergleich zu den Kontrollzellen, schwache PARP-1-Expression. Diese ist auf das Vorhandensein nicht transfizierter Zellen zurückzuführen, da bereits sieben Tage nach der Transfektion und mit dem Einsatz des Selektionsantibiotikums Zeocin, das nicht transfizierte Zellen abtötet, das PARP-1-Protein nicht mehr in diesen Zellen detektiert werden konnte.

Nach der transienten Transfektion primärer Mikrogliazellen mit dem asPARP-1-Vektor und der Kurzzeitselektion mit 10 µg Zeocin wurden die Zellen nach insgesamt fünf Tagen in Kultur auf die Expression des PARP-1-Proteins und auf die PARP-1-Aktivität überprüft. Die fünf Tage wurden übereinstimmend mit dem Zeitfenster und zur besseren Vergleichbarkeit der Versuche und in den organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (OHSK) gewählt, in denen die Primärzellen zunächst zwei Tage vormarkiert und anschließend für drei Tage auf den Schnittkulturen inkubiert wurden. Die detektierte PARP-1-Proteinexpression und die ermittelte PARP-1-Aktivität nach der Transfektion der Primärzellen und der anschließenden Kurzzeitselektion zeigten eine signifikante Verminderung der PARP-1-Aktivität im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten primären Mikrogliazellen, deren PARP-1-Expression und -Aktivität nach der Stimulation mit LPS unverändert war und bei 100 % lag. Die Detektion der CD11a-Expression auf asCD11a-transfizierten BV-2 Zellen erfolgte mit der FACS-Analyse und zeigte bereits bei unstimulierten Zellen eine signifikant verminderte Expression des Integrins auf asCD11a-transfizierten BV-2 Zellen im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Zellen. Nach der Stimulation der Zellen mit LPS stieg die Zahl an CD11a-Molekülen auf Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Zellen stark an. Dagegen zeigten asCD11a-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen nur einen schwachen Anstieg, bezogen auf die Expression des Adhäsionsmoleküls auf ihrer Zelloberfläche. Die Expression von CD11a war hierbei mit der auf unstimulierten Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Zellen ermittelten Expression vergleichbar. Damit ergab die Überprüfung der CD11a-Expression, daß das antisense-Konstrukt effektiv genug war, um sowohl mit als auch ohne LPS Stimulation die Expression des CD11a-Moleküls auf asCD11a-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Zellen signifikant herabzusetzen. Jedoch konnte die Expression des Integrins mit dem asCD11a-Vektor, im Gegensatz zur Expression der PARP-1 mit dem asPARP-1-Vektor, nicht vollständig inhibiert werden.

Trotz der erfolgreichen Proteininhibition in den asPARP-1- und CD11a-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen und den asPARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen war bis dahin noch unklar, ob die Zellen auch tatsächlich Veränderungen in ihren zellbiologischen Eigenschaften zeigen würden. Transfizierte Zellen, mit einer inhibierten PARP-1-Proteinexpression und verminderten CD11a-Expression, wurden nachfolgend für Experimente mit den organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (siehe 5.3) und für Zellkulturversuche (siehe 5.4) eingesetzt, um Effekte der antisense-Strategie zu untersuchen.

### 5.1.3 Superkultivierung vormarkierter antisense PARP-1 und antisense CD11a Mikrogliazellen auf organotypischen hippocampalen Schnittkulturen

Durch die klinische Relevanz und die relativ einfache Zytoarchitektur wurde die entorhinal-hippocampale Formation als Modellsystem für Untersuchungen zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Speziell wurde mit dem organotypischen hippocampalen Schnittkulturmodell (OHSK) gearbeitet, um die zellbiologischen Mechanismen nach einer exzitotoxischen Schädigung von Hirngewebe aufzuklären. Exzitotoxische Hirnschädigungen, die beispielsweise nach einem Hirninfarkt oder Schädel-Hirn-Trauma auftreten, führen zunächst zu einer primären Schädigung des Hirnparenchyms. Innerhalb von Stunden bis Tagen nach diesem Ereignis kommt es dann zu einer Invasion aktivierter Mikrogliazellen in die Region des neuronalen Schadens. Die Zellen setzen dort große Mengen an toxischen Zytokinen und Sauerstoffradikalen frei, was zu einer weiteren, sekundären neuronalen Schädigung führt (KUCUKKAYA et al., 1996; CEPEDA et al., 2001; ZERON et al., 2002). Die Größe dieses neuronalen Sekundärschadens kann dabei als Maßstab verwendet werden, um das zellzerstörerische Potential eingewanderter Mikrogliazellen zu beurteilen. Obwohl das Modell der OHSK nicht die gleiche Relevanz wie *in vivo* Studien an Tieren besitzt, eignet sich dieses System doch sehr gut, um Zell-Zell-Interaktionen im lebenden Gewebe zu testen und Ergebnisse, die aus der Zellkultur gewonnen wurden, zu überprüfen. Gewebeschnittkulturen bilden damit eine Zwischenstufe zwischen *in vitro* und *in vivo* Studien. In den verwendeten Schnittkulturen herrschen nach neun Tagen *in vitro* in den inneren Zonen auch bezüglich nicht-neuronaler Zellen organotypische und damit physiologische Verhältnisse. Explantationsbedingt finden sich zunächst noch amöboide, aktivierte Mikrogliazellen, diese zeigen jedoch nach neun Tagen in den mittleren Schichten der intakten Schnittkultur eine ramifizierte Morphologie (HAILER et al., 1996). Zur Auswertung des neuronalen Zelltodes und der Migration von Mikrogliazellen zu den Läsionsorten wurden deshalb nur jeweils die sechs mittleren Schichten eines Gewebeschnittes verwendet. Zur Induktion eines neuronalen Primärschadens wurde in den Lebendkulturen NMDA verwendet, da die Glutamatergische Exzitotoxizität eine wichtige Rolle bei akuten und chronischen Neurodegenerationen spielt (CHOI, 1998; PALMER, 1998). NMDA löst eine neuronale Zellschädigung (Primärschaden) durch die Überaktivierung exzitatorischer Aminosäurerezeptoren, in diesem Fall der ionotropen Glutamatrezeptoren, aus. Die in dieser Arbeit eingesetzte NMDA-Konzentration von 5  $\mu$ M führte, wie bei der Glutamatergischen Exzitotoxizität, zu einem erhöhten Kalziumeinstrom durch NMDA-aktivierte Kanäle in die Zelle (MODY & MACDONALD, 1995). Als Folge davon werden Stickstoffoxid über die neuronale Form der NO-Synthase (SZABÓ & DAWSON, 1998) und intraneuronale Sauerstoffradikale gebildet, die mit Makromolekülen reagieren und akkumulieren können und letztlich zum neuronalen Zelltod führen (HALLIWELL, 2001). Da das Modellsystem aus einem isolierten Gewebe bestand, wurden extern vormarkierte Mikrogliazellen auf die Schnittkulturen transferiert. Auf diese Weise sollte die *in vivo* Situation bei einem inflammatorischen Vorgang, wie beispielsweise einem Schlaganfall oder Hirntrauma, wiedergegeben werden, in der Mikrogliazellen aus dem umliegenden



Hirngewebe aktiviert werden können, proliferieren und zur Schadensstelle einwandern (AKIYAMA et al., 1994; JOHNSON et al., 1996). Die Akkumulation aktivierter Mikrogliazellen in der Nähe geschädigter Neurone ist mehrfach gezeigt worden: So gibt es Untersuchungen darüber, daß aktivierte Mikrogliazellen am „synaptic stripping“, dem Entfernen von Synapsen zugrundegehender Motoneurone beteiligt sind (STREIT et al., 1988). Desweiteren weiß man, daß verletzte Neurone bzw. anterograd degenerierende Axone von aktivierten Mikrogliazellen phagozytiert werden können (BECHMANN & NITSCH, 1997). Es ist generell akzeptiert, daß die distinkte Akkumulation von aktivierten Mikrogliazellen in pathologischen Regionen nicht nur auf der lokaler Proliferation beruht, sondern daß Mikrogliazellen darüber hinaus die Fähigkeit besitzen, aktiv zu den Orten neuronaler Schädigung zu migrieren (AKIYAMA et al., 1994; JOHNSON et al., 1996). Mikrogliazellen sind weiterhin in der Lage, die NMDA-Rezeptor vermittelte Exzitotoxizität durch die Bildung von Stickstoffoxid (NO) über die induzierbare Stickstoffoxidsynthetase (iNOS) zu erhöhen (KIM & KO, 1998) und zur Ausbildung eines Sekundärschadens beizutragen. Auf jeden Gewebeschnitt wurden  $1 \times 10^5$  Mikrogliazellen gegeben. Diese Zellzahl reichte aus, um einen Sekundärschaden nach NMDA-Läsion über eben diese Zellen zu verursachen. Über drei Tage wurde nach der NMDA-Läsion die Migration der Mikrogliazellen zum Ort der Neurodegeneration bzw. der neuronale Zelltod zunächst im intakten Schnitt fluoreszenz- und lichtmikroskopisch dokumentiert. Durch die Vormarkierung der Zellen waren diese sehr gut im Gewebe zu lokalisieren. Anschließend erfolgte nach der Fixierung an Kryostatschnitten die statistische Auswertung. Die Dokumentation der Ergebnisse wurde somit zweimal durchgeführt, zum einen direkt im lebenden Hirngewebe und zum anderen nach der Fixierung der Gewebeschnitte. Die Gewebekulturen wurden am dritten Tag nach der Schädigung und dem Zelltransfer fixiert, da zu diesem Zeitpunkt die Ausbildung der Schädigung, sowie die Invasion der Zellen am deutlichsten zu erkennen war. Dies entspricht auch Beobachtungen aus *in vivo* Untersuchungen, in denen zwei bis acht Tage nach einer chemischen oder mechanischen Kortexläsion die degenerativen Prozesse und die mikrogliale Phagozytose ihr Maximum erreichen (MORGAN et al., 1993). Die Ermittlung des neuronalen Zelltodes wurde, ebenso wie bei den Untersuchungen zum Migrationsverhalten, auf den Gyrus dentatus (DG) und das Cornu ammonis (CA) beschränkt, da diese Strukturen hauptsächlich durch NMDA geschädigt werden und sehr gut im Schnitt zu lokalisieren sind. Die Pyramidenzellen des Cornu ammonis zeigten dabei eine besonders starke Anfälligkeit gegenüber einer NMDA-Schädigung, da diese Zellen eine hohe Dichte an Glutamatrezeptoren aufweisen (BEAMAN-HALL et al., 1998).

#### **5.1.3.1 Untersuchungen zum neuronalen Zelltod**

Mit diesen Versuchen sollte zunächst die Hypothese getestet werden, ob eine Hemmung der mikroglialen PARP-1 vor einem sekundärem neuronalen Zellschaden schützt. Das System der OHSK ermöglichte dabei eine direkte Untersuchung der neuronal-mikroglialen-Interaktionen im lebenden

Hirngewebe. In den Versuchen mit der OHSK wurden sowohl Kontrollvektor- als auch antisense PARP-1-transfizierte BV-2 Zellen eingesetzt, um auszuschließen, daß transfizierte Zellen, die nur den Leervektor enthielten, einen Effekt auf die Eigenschaften von Mikrogliazellen nach Aktivierung ausüben. Als Zelltodmarker wurde Propidiumjodid (PI) eingesetzt, ein Marker, mit dem nicht zwischen einem nekrotischen und apoptotischen Zelltod unterschieden werden kann. Für die Fragestellungen dieses Versuchsprojektes reichte der allgemeine Zelltodmarker jedoch aus, da gerade der für den Funktionsverlust verantwortliche gesamte neuronale Schaden erfaßt werden sollte.

Nach der Vorschädigung mit NMDA kam es in allen Versuchsgruppen zu einem Anstieg der Zelltodrate (Primärschaden) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wodurch abgesichert war, daß die chemische Schädigung mit der eingesetzten Menge an NMDA funktionierte. Die unbehandelten Kontrollen zeigten auch einige tote Zellen, die jedoch auf den präparationsbedingten Zelltod in den Schnittkulturen zurückzuführen waren. Die Gruppe, in der Kontrollvektor-transfizierte Mikrogliazellen nach NMDA-Schädigung auf den Schnitt gegeben worden waren, zeigte einen massiven Sekundärschaden, der nahezu doppelt so groß wie der nur durch NMDA induzierte Primärschaden war. Dieses Ergebnis beweist auch in diesem Modellsystem das neurodegenerative Potential von Mikrogliazellen, die nach ihrer Aktivierung in der Lage sind, zum Ort der neuronalen Schädigung spezifisch zu migrieren und dort zytotoxische Produkte freizusetzen (BANATI et al., 1993a). Zu diesen zytotoxischen Substanzen können reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffradikale, Stickstoffmonoxid sowie proinflammatorische Zytokine und Glutamat gehören (CHAO et al., 1995; HANISCH, 2002; BARGER & BASILE, 2001). Schnittkulturen, die mit dem PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-ABA) vorbehandelt worden waren, wiesen eine verminderte Zelltodrate im Vergleich zu dem Gewebe auf, das nur mit NMDA inkubiert worden war. In Schnittkulturen, die vor dem Transfer von Kontrollvektor-transfizierten Mikrogliazellen mit dem unspezifischen PARP-Inhibitor 3-ABA vorbehandelt worden waren, war ebenfalls eine Reduktion des neuronalen Sekundärschadens zu beobachten. Diese Ergebnisse bestätigen Befunde von Wang et al. und Eliasson et al., die ebenfalls eine Reduktion des neuronalen Schadens, nach chemischer Hemmung der PARP im gesamten Gewebeverband zeigen (WANG et al., 1997; ELIASSON et al., 1997).

Dieser Sekundärschaden konnte erheblich, d. h. um mehr als die Hälfte, in Schnitten reduziert werden, die mit antisense PARP-1-transfizierten Zellen nach NMDA-Schädigung inkubiert worden waren. Darüber hinaus zeigten die Schnittkulturen nach der Invasion der asPARP-1 Mikrogliazellen, daß die neuronale Zelltodrate sogar unter der des mit NMDA induzierten Primärschadens lag. Da Mikrogliazellen, die auf Schnittkulturen nach NMDA-Schädigung transferiert worden waren, nur eine leicht verminderte Vitalität aufwiesen und kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten Mikrogliazellen gefunden werden konnte, ist dieser reduzierte neuronale Schaden nicht auf eine verminderte Vitalität der aktivierten asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen zurückzuführen.

Die Versuche zum neuronalen Zelltod wurden anschließend mit Primärzellen wiederholt, da BV-2 Zellen zwar ähnliche funktionelle und morphologische Eigenschaften wie die Primärzellen aufweisen (LAURENZI et al., 2001), aber dennoch nicht vollständig die physiologische Situation widerspiegeln. Nachdem eine ausreichende Suppression der PARP-1 in antisense PARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen festgestellt werden konnte (siehe 4.9.2), wurden diese Zellen, sowie Primärzellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, für Versuche in der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSK) eingesetzt. Der Transfer von Kontrollvektor-transfizierten primären Mikrogliazellen auf NMDA vorgeschädigte Schnittkulturen führte im Vergleich zu unbehandelten Kontrollschnitten zur Ausbildung eines massiven sekundären Schadens. Dieser wurde durch eine verstärkte Rot (PI)-Fluoreszenz in den neuronalen Zellschichten des Hippokampus, dem Gyrus dentatus und dem Cornu ammonis, deutlich sichtbar. Nach dem Transfer von asPARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen wurde dieser Sekundärschaden nahezu aufgehoben. Die neuronale Protektion durch primäre asPARP-1 Mikrogliazellen war effektiver als die Protektion durch die PARP-Inhibition im gesamten Gewebe mit 3-ABA. Die asPARP-1 Mikrogliazellen waren sogar in der Lage, den neuronalen Schaden auf einen Wert herabzusetzen, der signifikant unter dem des Primärschadens durch NMDA-Behandlung lag. Dieses Ergebnis bestätigt die neuroprotektive Tendenz der Experimente, die mit asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen gemacht worden waren. Interessanterweise lag die Zahl der toten hippocampalen Neurone sogar unter dem Niveau des Primärschadens ohne nachfolgende Zugabe von Mikrogliazellen und zwar noch deutlicher als im Falle der zugegebenen asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen in den vorausgegangenen Versuchen. Die spezifische Ausschaltung der PARP-1 in primären Mikrogliazellen führte damit nicht nur zur kompletten Verhinderung eines neuroinflammatorischen Sekundärschadens, sondern sogar zu einer verbesserten Neuroprotektion initial geschädigter Neurone. Wie bereits in den Versuchen mit den BV-2 Zellen wurde auch hier die Vitalität der primären Mikrogliazellen nach der Invasion in das Hirngewebe überprüft. Primäre Mikrogliazellen zeigten nach dem Transfer auf die Schnittkulturen eine leicht verminderte Vitalität, es konnte aber kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen festgestellt werden.

Da der neuronale Zelltod letztendlich drei Tage nach der Induktion des Primärschadens mit NMDA ermittelt wurde, könnte die Abnahme der neuronalen Zelltodrate durch die Zugabe asPARP-1-defizienter Mikrogliazellen entweder mit einem verspäteten neuronalen Zelltod und/oder einer Regeneration sublethal geschädigter Neurone und initial überlebender Neurone begründet werden, da Mikrogliazellen ebenso neuroprotektive Mediatoren produzieren können. Hierzu gehören die Zytokine TGF- $\beta$  und IL-10, die in der Lage sind, die Mikroglia/Makrophagen-Aktivierung über die Herunterregulierung der Moleküle, die in die Antigenpräsentation und Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine sowie Stickstoff- und Sauerstoffradikale involviert sind, zu inhibieren (FREI et al., 1994; O'KEEFE et al., 1999; HANISCH, 2002). Weiterhin hemmt TGF- $\beta$  die neuronale Apoptose. Hier liegt also die Vermutung nahe, daß eine Inhibition der PARP-1 in

Mikrogliazellen eher die destruktiven Eigenschaften der Immunzellen unterdrückt als die protektiven. Es ist bekannt, daß die PARP-1 die Expression verschiedener Proteine auf der Transkriptionsebene reguliert. Von besonderer Bedeutung sind dabei die inflammatorischen Mediatoren wie die iNOS und proinflammatorische Zytokine (HAUSSCHILDT et al., 1992; LE PAGE et al., 1998; SZABÓ, 1998); OLIVER et al., 1999), das Oberflächenprotein ICAM-1 (ZINGARELLI et al., 1998; SZABO et al., 2001) und MHC-II-Moleküle (OTUSAKA et al., 1991). Ebenso konnte gezeigt werden, daß in PARP-1<sup>-/-</sup> Gliazellen nach LPS-Aktivierung die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 sowie die iNOS-Produktion und ICAM-1-Expression reduziert waren (HA et al., 2002). Es ist also durchaus vorstellbar, daß die Inhibition der PARP durch einen antisense PARP-1-Vektor, die Bildung dieser zytotoxischen Substanzen bzw. immunologisch relevanten Moleküle beeinflusst. Weiterhin hat die PARP als Koaktivator in der NF- $\kappa$ B-vermittelten Transkription eine entscheidende Funktion. Da NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei der Produktion inflammatorischer Gene nach einer neuronalen Schädigung spielt und an der Gliazellaktivierung und der damit verbundenen Zytotoxizität erheblich beteiligt ist (COMBS et al., 2001; NGUYEN et al., 2002), könnte die Inhibition der PARP-1 ein potientielles Ziel darstellen, um unter anderem die NF- $\kappa$ B-abhängigen proinflammatorischen Signalwege in Mikrogliazellen zu hemmen, die zu der Ausbildung eines neuronalen Sekundärschadens führen können. Die Modulation der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription durch die PARP kann dabei durch die katalytische Aktivität der PARP gesteuert werden oder durch eine nicht kovalente Protein-Protein-Interaktion (HASSA & HOTTIGER, 1999; KAMEOKA et al., 2000; CHANG & ALVAREZ-GONZALEZ, 2001; HASSA et al., 2001).

Da sich weiterhin weniger vormarkierte Zellen in den neuronalen Schichten der asPARP-1-Gruppe im Vergleich zur Kontrollvektor-Gruppe finden ließen, wurde nachfolgend das Migrationsverhalten der antisense PARP-1-transfizierten Mikrogliazellen zu den Orten der Neurodegeneration näher untersucht.

### **5.1.3.2 Analyse der regionspezifischen Migration**

Die Ergebnisse der Migrationsversuche in den OHSK zeigten eindeutig, daß BV-2 Mikrogliazellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, in der Lage waren, nach einer NMDA-Schädigung massiv in die Regionen der neuronalen Schädigung (DG und CA-Region) einzuwandern. BV-2 Mikrogliazellen, die mit dem antisense PARP-1-Vektor transfiziert worden waren, konnten zwar in das Hirngewebe eindringen, dagegen ließ sich aber bei diesen Zellen keine Migrationspräferenz in die Schädigungsgebiete feststellen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in dieser Arbeit als nächstes auf an der Migration beteiligte Moleküle fokussiert. Die Rekrutierung von Leukozyten aus der Körperperipherie in das ZNS ist ein entscheidender Schritt bei neuroinflammatorischen Vorgängen und bei der Induktion der ZNS-Autoimmunität. Bei diesem Prozeß spielen Chemokine, die im Hirngewebe von Astrozyten, Mikrogliazellen und Endothelzellen gebildet werden können, eine

wichtige Rolle (GLABINSKI & RANSOHOFF, 1999; HESSELGESSER & HORUK, 1999; RANSOHOFF, 2002). Vieles deutet darauf hin, daß Chemokine die Migration von Mikrogliazellen zu den Orten neuronaler Schädigung beeinflussen können (PETERSON et al., 1997; MACIEJEWSKI-LENOIR et al., 1999; SORIANO et al., 2002). Aktivierte Mikrogliazellen sind weiterhin durch die Expression von Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet (HAILER et al. 1996). Adhäsionsmoleküle sind an der Zellerkennung und Kommunikation zwischen Zellen des Immunsystems beteiligt und gewährleisten eine effiziente Immunantwort bei einem Entzündungsprozeß (SPRINGER, 1990). Der durch Adhäsionsmoleküle bewirkte Zell-Zell-Kontakt setzt eine Vielzahl von Reaktionen in Gang: So werden intrazellulär Botenstoffe aktiviert, welche die Genexpression für bestimmte Moleküle induzieren und häufig eine Umgestaltung des Zytoskeletts und letztendlich eine Zellmigration bewirken (GUMBINER, 1996). Aufgrund dieser Erkenntnisse standen zur Aufklärung des gestörten Migrationsverhaltens der Mikrogliazellen zwei Methoden zur Auswahl: Die Messung der Chemokinfreisetzung oder die Ermittlung der Expression von Adhäsionsmolekülen. Von den beiden Methoden wurde die letztgenannte gewählt. FACS-Analysen zur Messung der Expression von Oberflächenmolekülen auf asPARP-1-Zellen zeigten dabei eine signifikant verminderte Expression des Integrins CD11a, sowohl auf unstimulierten als auch auf aktivierten BV-2 Mikrogliazellen im Vergleich zu BV-2 Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren. Die Hemmung war dabei spezifisch für das Integrin CD11a, da andere, in die Analysen einbezogenen Oberflächenproteine wie CD11b, CD18 und ICAM-1 unbeeinflusst blieben. Daraufhin wurde entschieden, diesem Befund näher nachzugehen, und es wurde ein pcDNA3.1(+) asCD11a-Vektor hergestellt, der die Expression dieses Integrins inhibieren sollte. Mit den antisense CD11a-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen wurde der Migrationsversuch, der bereits mit asPARP-1-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen durchgeführt worden war, in der Schnittkultur wiederholt. Die Versuche zeigten, daß Mikrogliazellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, in der Lage waren, nach einer NMDA-Schädigung massiv in die Regionen der neuronalen Schädigung des DG und des CA einzuwandern. Mikrogliazellen, die mit dem antisense CD11a-Vektor transfiziert worden waren, konnten zwar in das Hirngewebe eindringen, die Zellen zeigten jedoch keine Migrationspräferenz.

In der Schnittkultur wurde ebenfalls die Fähigkeit der asPARP-1-transfizierten primären Mikrogliazellen, gerichtet zu den Orten der Neurodegeneration zu migrieren, untersucht. Die regionspezifische Migration wurde wie bei den Versuchen mit den asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen durchgeführt, ermittelt. Auch hier zeigte sich, daß Kontrollvektor-transfizierte primäre Mikrogliazellen spezifisch in die Gebiete der neuronalen Läsion migrierten, während asPARP-1-transfizierte Zellen nicht in der Lage waren regionspezifisch einzuwandern. Die Inhibition der PARP mit 3-ABA im gesamten Hirngewebe führte zu einer gestörten Migration der Mikrogliazellen, jedoch nicht in dem Maße, wie sie bei asPARP-1 transfizierten Mikrogliazellen zu finden war. Interessanterweise zeigten asPARP-1 transfizierte primäre Mikrogliazellen eine Restaktivität der

PARP von 40,4 +/- 3,0 % im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten Zellen, während die PARP-Aktivität in primären Mikrogliazellen, die mit 1 mM 3-ABA behandelt worden waren, unter 5 % lag. Trotzdem führte die Transfektion von Mikrogliazellen mit dem asPARP-1-Vektor im Vergleich zu primären Mikrogliazellen, deren PARP mit 3-ABA inhibiert worden war, zu einer höheren Neuroprotektion und vermehrten Störung der Migration im gesamten Hirngewebe.

Insgesamt konnten die Ergebnisse, die mit BV-2 Zellen über das Migrationsverhalten und die Induktion des neuronalen Zelltods nach Inhibition der PARP-1 gewonnen worden waren, mit den Primärzellen bestätigt und reproduziert werden. Die Ergebnisse zeigten zusammenfassend, daß die Fähigkeit von Mikrogliazellen, regionsspezifisch zu Läsionsorten zu migrieren, zum einen von der CD11a-Expression abhängig ist und zum anderen, daß die Expression von CD11a durch das nukleäre Enzym PARP-1 in aktivierten Mikrogliazellen reguliert wird. Aufgrund der in den Gewebeschnittkulturen gewonnenen Erkenntnisse sollte in nachfolgenden Versuchen der intrazelluläre Signalweg der mikroglialen CD11a-Expression aufgeklärt werden.

An dieser Stelle soll noch kurz erwähnt werden, daß für das Forschungsvorhaben PARP<sup>-/-</sup> Mäuse zur Verfügung standen. Nach der Präparation der primären Mikrogliazellen aus diesen Knockout-Tieren konnte jedoch über die Immunoblot-Technik ein Signal für die PARP in den Zellen detektiert werden. Die Neurone dieser Tiere zeigten dagegen keine PARP-Proteinexpression. Woher letztendlich die PARP-Expression in den Mikrogliazellen dieser Tiere stammt, bleibt eine Vermutung: So könnten beispielsweise andere Mitglieder aus der „PARP-Familie“ die Funktion der PARP-1 übernommen haben und von der Zelle, um den Ausfall zu kompensieren, vermehrt exprimiert worden sein. Weiterhin weisen PARP<sup>-/-</sup> Tiere eine genomische Instabilität auf, wobei eine erhöhte Anzahl an Mikronuklei, eine verzögerte Basenaustauschreparatur und eine hohe Frequenz an Schwesterchromatid-Austauschvorgängen zu beobachten ist (OIKAWA et al., 1999; SIMBULAN-ROSENTHAL et al., 2000; VIRAG & SZABÓ, 2002). Diese genomische Instabilität macht sekundäre adaptive Mechanismen in PARP<sup>-/-</sup> Mikrogliazellen möglich und erschwert eine Vergleichbarkeit mit den antisense PARP-1-transfizierten Mikrogliazellen, weshalb entschieden wurde, diese Tiere nicht in die Untersuchungen mit einzubeziehen.

#### **5.1.4 Untersuchungen zur PARP-1 regulierten mikroglialen CD11a-Expression**

Mit dieser Versuchsreihe, die an BV-2 Mikrogliazellen *in vitro* durchgeführt wurde, sollten die Mechanismen der Regulation der CD11a-Expression aufgeklärt werden. Es wurde dabei die Hypothese getestet, ob das PARP-1-Protein allein oder die aktivierte und poly(ADP-ribosy)ierte PARP-1 die CD11a-Expression in Mikrogliazellen reguliert. Weiterhin sollte analysiert werden, ob es weitere Moleküle neben der PARP-1 gibt, die einen Einfluß auf den intrazellulären Signalweg der CD11a-Expression haben. Da die Funktionsanalysen der BV-2 Zellen eine gute Reproduzierbarkeit mit den Ergebnissen zeigten, die durch den Einsatz primärer Mikrogliazellen gewonnen worden waren, wurden für die mechanistischen Untersuchungen erneut BV-2 Zellen als Modellsystem

gewählt. Die permanente Zelllinie bot zusätzlich den Vorteil, daß innerhalb kurzer Zeit sehr viel Zellmaterial gewonnen werden konnte.

Zur Aktivierung von Mikrogliazellen in der Zellkultur wurde in allen Versuchen dieser Arbeit LPS eingesetzt. LPS ist eine Glykolipidkomponente der Außenmembran gram-negativer Bakterien und ein potentes Proinflammagen. Es wird häufig in Versuchen eingesetzt, in denen Zellen des Immunsystems stimuliert werden sollen (MORIMOTO et al., 2002). *In vitro* führt LPS nachweislich zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen, die sich in einer amöboiden Morphologie und in der Freisetzung zytotoxischer Substanzen wie beispielsweise NO und TNF- $\alpha$  äußern (CHAO et al., 1992; HEMMER et al., 2001). In BV-2 Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert worden waren, wurde die PARP mittels des PARP-Inhibitors 3-ABA gehemmt. 3-ABA gehört als Benzamid-Analogon zusammen mit Nikotinamid zu den „klassischen“ poly(ADP-ribose)Polymerase-Inhibitoren, die seit ungefähr 20 Jahren ihren Einsatz finden. 3-ABA zeigt eine geringe Toxizität und hohe Selektivität, weshalb dieser Inhibitor einen weitverbreiteten Einsatz in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien findet (SZABÓ & DAWSON, 1998). Zu den neueren hochpotenteren PARP-Inhibitoren zählen Isoquinoline (ZHANG et al., 1994) und Benzopyrone (BAUER et al., 1995), deren Nebenwirkungen jedoch bisher noch unzureichend charakterisiert sind.

Zunächst wurde die CD11a-Expression in Abhängigkeit von der PARP-1-Aktivität und der Translokation von NF- $\kappa$ B nach Stimulation der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt, da NF- $\kappa$ B ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei inflammatorischen und immunologischen Prozessen, sowie bei der Zellteilung und bei Apoptosevorgängen ist (NOMOTO et al., 2001; MATTSON & CAMANDOLA, 2001). Weiterhin sind funktionelle NF- $\kappa$ B-Komplexe in allen Zelltypen des Gehirns zu finden (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997) und bestehen aus fünf Mitgliedern einer multigenen Familie: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel und Rel-B). Die funktionelle Wichtigkeit von NF- $\kappa$ B bei akuten inflammatorischen Prozessen liegt an der Fähigkeit, die Promotoren von verschiedenen Genen zu regulieren, die für die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen codieren und kritisch für den Entzündungsvorgang sind (MATTSON & CAMANDOLA, 2001, COMBS et al., 2001). Die automodifizierte PARP-1 ist neben der DNA-Reparatur ebenso an der Transkriptionskontrolle und Genexpression beteiligt. Dabei übt die Interaktion der PARP-1 entweder einen positiven oder einen negativen Effekt auf den Transaktivierungsprozeß aus (BÜRKLE, 2001). Weiterhin gilt die PARP-1 als ein Kofaktor bei der NF- $\kappa$ B-vermittelten Transaktivierung, die eine entscheidende Rolle bei Immunreaktionen und inflammatorischen Prozessen spielt (OLIVER et al., 1999; KAMEOKA et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, daß BV-2 Zellen, deren PARP durch 3-ABA inhibiert worden war, eine Abnahme der CD11a-Expression auf der Oberfläche der Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen. Dabei erreichte die Abnahme der CD11a-Expression jedoch nicht das Niveau von Mikrogliazellen, die mit dem asPARP-1-Vektor transfiziert worden waren. Der Unterschied kann hier entweder damit begründet werden, daß die PARP-Aktivität nicht vollständig

gehemmt werden konnte, da in den 3-ABA behandelten Zellen noch eine residuale PARP-1-Aktivität gemessen werden konnte, die bei 5 % lag, oder durch die Existenz eines PARP-1-unabhängigen Signalweges der CD11a-Expression. Es liegt jedoch eher die Vermutung nahe, daß das PARP-Protein allein, auch ohne die katalytische Aktivität, einen Einfluß auf die Verminderung der CD11a-Expression nimmt. Hassa & Hottiger zeigten in ihrer Arbeit dazu, daß die PARP bei der Transkription vermutlich als Kofaktor wirkt, wobei es zu einer Protein-Protein-Interaktion zwischen der PARP und p65 im Nukleus und zu einer Modifizierung von NF- $\kappa$ B und anderer Proteine kommt (HASSA & HOTTIGER, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß in BV-2 Zellen mit 3-ABA-Behandlung zwar die Aktivität der PARP gehemmt werden konnte, die Proteinexpression jedoch unbeeinflusst blieb, während in BV-2 Zellen, die mit dem asPARP-1 Vektor transfiziert worden waren, das gesamte Protein nicht mehr detektiert und damit eine stärkere Reduktion der CD11a-Expression festgestellt werden konnte. Auch Mikrogliazellen, die mit BAY und LPS behandelt worden waren, zeigten eine verminderte CD11a-Expression. Diese war jedoch nicht so stark, wie die Reduktion, die durch die Hemmung der PARP mit 3-ABA erzielt werden konnte. Trotzdem scheint auch NF- $\kappa$ B einen Einfluß auf die Integrinexpression auszuüben.

Kernisolationen wurden durchgeführt, um den PARP-1-Proteingehalt und das Translokationsverhalten von NF- $\kappa$ B in nativen oder mit LPS stimulierten BV-2 Zellen zu untersuchen. Ergebnisse von Immunoblots isolierter Zellkerne nach Hemmung der PARP mit 3-ABA zeigten dabei eine reduzierte NF- $\kappa$ B-Translokation. Um aufzuklären, ob dieses Ergebnis auf einen PARP-abhängigen Effekt von 3-ABA zurückzuführen ist, wurde zum Vergleich die nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B in Lysaten isolierter Nuklei von unstimulierten und aktivierten Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen untersucht. Zwischen beiden Gruppen konnte dabei kein Unterschied, bezogen auf die nukleäre p65-Konzentration im Zellkern, ermittelt werden. Dieses Ergebnis bestätigen auch vorausgegangene Experimente von Hassa & Hottiger und Oliver, in denen gezeigt werden konnte, daß die nukleäre Translokation von p65 in PARP<sup>-/-</sup>-Zellen nach Stimulation mit ultraviolettem Licht oder nach TNF- $\alpha$ -Behandlung nicht vermindert war (HASSA UND HOTTIGER, 1999; OLIVER et al., 1999). Daher ist die geringgradige Abnahme der NF- $\kappa$ B-Translokation nach der Behandlung mit 3-ABA vermutlich auf einen unspezifischen Effekt des Inhibitors zurückzuführen.

Mit der Northern Blot Technik sollte die Regulation der CD11a-mRNA-Expression in Kontrollvektor- und asPARP-1-transfizierten BV-2 Zellen auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden. Die Inhibition der NF- $\kappa$ B-Translokation erfolgte mit BAY in Kontrollzellen und asPARP-1-transfizierten Zellen. In Kontrollvektor-transfizierten Zellen wurde die PARP-1 mit 3-ABA gehemmt. Damit wurde in diesem Versuch gleichzeitig die Wirkung des intrazellulären asPARP-1-Konstruktes im Vergleich zu einer externen Hemmung der PARP in Kontrollvektor-transfizierten Zellen mit einem chemischen Inhibitor auf die Expression der CD11a-mRNA verglichen. Nach LPS-Stimulation konnte eine geringere CD11a-mRNA-Expression in asPARP-1-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden, die mit 3-ABA behandelt worden waren, was auf einen stärkeren inhibitorischen



Effekt des as-Konstruktes hinweist und Ergebnisse bestätigt, die mit der FACS-Analyse gewonnen werden konnten. Die Inkubation der Zellen mit beiden Inhibitoren gleichzeitig führte nicht zu einer doppelten bzw. noch stärkeren Verminderung der CD11a-Expression, was gegen eine NF- $\kappa$ B-unabhängige Aktivität der PARP-1 spricht. Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse zeigten zusammenfassend, daß die CD11a-mRNA-Expression zum Teil auf transkriptioneller Ebene von einer kooperativen Aktion des PARP-1-Moleküls und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B reguliert wird. In anderen Arbeiten konnte dazu gezeigt werden, daß die Expression von Adhäsionsmolekülen in anderen nicht mikroglialen Zellen durch NF- $\kappa$ B reguliert wird (ROEBUCK & FINNEGAN, 1999). Auch wurde die nukleäre Translokation und DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B in Mikrogliazellen nach LPS-Stimulation beobachtet (GABRIEL et al., 1999; HEYEN et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die PARP-1 für eine spezifische transkriptionale Aktivierung von NF- $\kappa$ B notwendig ist (OLIVER et al., 1999; KAMEOKA et al., 2000).

Mit der Immunpräzipitation, die sich gut für Ko-Präzipitationen und den direkten Nachweis von Proteininteraktionen eignet, konnte in aktivierten Kontrollvektor transfizierten BV-2 Mikrogliazellen eine Protein-Protein-Interaktion der PARP-1 mit NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden. In aktivierten, Kontrollvektor-transfizierten BV-2 Mikrogliazellen mit einer PARP-Hemmung konnte ebenfalls eine Protein-Protein-Interaktion der PARP-1 mit NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden, jedoch war das Signal hier geringer. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß die PARP nicht nur mit ihrer katalytischen Aktivität, sondern auch als Protein allein in den Transkriptionsprozeß eingreifen kann. Das High mobility group Protein HMG-I(Y) wurde mit in die Untersuchungen einbezogen, nachdem Histone keine Präzipitation mit dem PARP-1-NF- $\kappa$ B-Komplex zeigten. HMG-I(Y) ist ein hoch konserviertes Protein, das an die DNA bindet und die Transkription von Genen ermöglicht (YANG et al., 2001). Durch die Bindung an die DNA und die Veränderung der Chromatinstruktur kann HMG-I(Y) positive oder negative Effekte auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die entsprechenden Promotorregionen ausüben. HMG-I(Y) kontrolliert beispielsweise Promotoren für die Zytokin- und iNOS-Expression, die den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B für die maximale Expression benötigen (PELLACANI et al., 1999; ZHANG & VERDINE, 1999). Das Protein HMG-I(Y) zeigte in den in dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen eine Interaktion mit dem PARP-1-NF- $\kappa$ B-Komplex über die poly(ADP-ribosyl)ierte PARP. Damit scheint die vollständige Expression von CD11a von der PARP-Aktivität und dem PARP-Protein zusammen abzuhängen, da es beim Fehlen des PARP-1-Proteins in asPARP-1-Zellen zu einer verminderten CD11a-Expression kommt und die Expression des Integrins ebenso in Zellen vermindert ist, deren PARP-1-Aktivität inhibiert wurde. Die Protein-Protein-Interaktion scheint hauptsächlich zwischen NF- $\kappa$ B und dem PARP-1-Protein stattzufinden, da asPARP-1-Zellen eine stärkere Reduktion des Oberflächenproteins und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zeigten. Bezogen auf die Interaktion der PARP-1 mit dem HMG-1(Y) Protein, ist die Komplexbildung dagegen erst durch die aktivierte PARP und nicht nur durch das PARP-Protein allein möglich.

Da für Ko-Immunpräzipitationen Kontrollvektor-transfizierte BV-2 Zellen eingesetzt worden waren, in den Funktionsanalysen mit den Gewebekulturen aber asPARP-1-transfizierte BV-2 Zellen ihren Einsatz fanden, wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt, um den Einfluß des asPARP-1-Vektors auf die Gesamtproteinexpression von NF- $\kappa$ B und von HMG I(Y) und auf das Translokationsverhalten von NF- $\kappa$ B auszuschließen. Der antisense PARP-1-Vektor hatte dabei weder einen Einfluß auf die Gesamtproteinexpression, noch übte er einen Effekt auf das Translokationsverhalten aus. Mit diesen Ergebnissen konnten unspezifische Wirkungen durch den antisense-Vektor ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Untersuchungen über die CD11a-Expression in aktivierten Mikrogliazellen, daß die PARP-1 in den Signalweg der CD11a-Expression, der die regionspezifische Einwanderung der mikroglialen Migration kontrolliert, direkt eingreift. Dieser Signalweg schließt die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sowie dessen direkte Protein-Protein-Interaktion mit der aktivierten PARP-1 mit ein. In anderen Arbeiten konnte dazu gezeigt werden, daß die PARP-1 bei der Transkription vermutlich als Kofaktor wirkt, wobei es zu einer Protein-Protein-Interaktion zwischen der PARP und p65 im Nukleus und zu einer Modifizierung von NF- $\kappa$ B und anderer Proteine kommt (HASSA & HOTTIGER, 1999) und weiterhin, daß die PARP-1 über ihre katalytische Aktivität die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch eine Poly(ADP-ribosyl)ierung von NF- $\kappa$ B beeinflusst (KAMEOKA et al., 2000; CHANG & ALVAREZ GONZALEZ, 2001). Das nicht zu den Histonen gehörende aber chromosomale Protein HMG-1(Y), ein bekannter Koaktivator der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription (THANOS & MANIATIS, 1995; PERRELLA et al. 1999) und ein Substrat für die PARP (TANUMA & JOHNSON, 1983), konnte als dritter Interaktionspartner ermittelt werden. HMG-1(Y) wurde bereits in anderen Arbeiten als Teilnehmer bei der NF- $\kappa$ B-Bindung und Transaktivierung des iNOS-Promotors beschrieben (PELLACANI et al., 1999; ZHANG & VERDINE, 1999).

## **5.2 Funktion der PARP-1 bei der Aktivierung und Migration von Mikrogliazellen und Monozyten/Makrophagen**

Mikrogliazellen können infolge einer Infektion oder Verletzung des ZNS aktiviert werden. Sie transformieren dann von einer ruhenden, residenten Zelle, die hauptsächlich die Mikroumgebung des ZNS kontrolliert, in eine amöboide, phagozytotisch aktive Zelle, die in Analogie zu Blutmakrophagen ein zellzerstörendes Potential entwickeln kann. Da es im ZNS kaum ein pathologisches Ereignis gibt, an dem Mikrogliazellen nicht beteiligt sind, wird deutlich, welche wichtige Position diese Zellen in der Erforschung und Bekämpfung neuropathologischer Vorgänge einnehmen. Viele Forschungsarbeiten beschäftigen sich deshalb mit der Aufklärung mikroglialer Signalwege, um Faktoren zu identifizieren, die an dieser Aktivierungskaskade regulierend teilnehmen. Bei der Untersuchung der Rolle der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK), konnten dabei p38 (WILMS et al., 2003; TORTAROLO et al., 2003), MEK 1/2 (WANG et al., 2003) sowie ERK 1/2 (CHENG et al.,

2003) als Teilnehmer der Ausbildung destruktiver Faktoren, wie beispielsweise proinflammatorischer Zytokine, ermittelt werden. Ebenso beschäftigen sich viele Forschungsarbeiten mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, einem der wichtigsten Modulatoren der Genexpression bei neuroinflammatorischen Ereignissen. Im Gehirn kann die erhöhte Expression von NF- $\kappa$ B als Antwort auf eine experimentelle Verletzung oder bei neuropathologischen Erkrankungen nachgewiesen werden, wobei eine vermehrte Bildung von NF- $\kappa$ B entweder zur Neurodegeneration oder zur Neuroprotektion beiträgt. (SANZ et al., 2002; NOMOTO et al., 2001; HEESE et al., 2002; MATTSON & CAMANDOLA, 2001). Untersuchungen über die mikroglialen Aktivierungsmechanismen und Faktoren, die an der Aktivierungskaskade teilnehmen, bildeten auch den Schwerpunkt dieser Arbeit. Im Mittelpunkt stand dabei das nukleäre Enzym PARP-1, das nach DNA-Strangbrüchen aktiviert wird und so an Reparaturprozessen der Zelle teilnimmt (HA et al., 2002). Die PARP-1 kann ebenso auf die Regulation von Transkriptionsfaktoren und der damit verbundenen Transkription von Genen, die bei Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle spielen, einen Einfluß nehmen, und hat dabei entweder einen hemmenden oder aktivierenden Effekt auf die Transkription (D'AMOURS et al., 1999).

In eigenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, daß in aktivierten Mikrogliazellen die PARP-1-Aktivität erhöht ist und an der Regulation eines wichtigen antioxidativen Schutzsystems teilnimmt (ULLRICH et al., 2001). In der nun vorliegenden Arbeit konnte aufgeklärt werden, daß und wie die PARP-1 in den Prozeß der Mikrogliaaktivierung über die Regulation des  $\beta_2$ -Integrins CD11a eingreift.  $\beta_2$ -Integrine zählen zu einer wichtigen Molekülklasse, die das Verhalten von Immunzellen reguliert (SPRINGER, 1990). Obwohl die Rolle von Adhäsionsmolekülen im Gehirn noch nicht ausreichend charakterisiert ist, können jedoch bestimmte Aufgaben von Adhäsionsmolekülen auf peripheren Zellen wie die Leukozyten Extravasation durch die Blut-Hirn-Schranke und deren Migration sowie die Antigenpräsentation auf das ZNS übertragen werden (LEE & BENVENISTE, 1999). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auf der funktionellen Ebene, daß aktivierte Mikrogliazellen das Integrin CD11a benötigen, um regionspezifisch zu den Orten eines neuronalen Schadens zu migrieren und auf der mechanistischen Ebene, daß die aktivierte PARP-1 über eine Protein-Protein-Interaktion mit NF- $\kappa$ B und HMG-1(Y) die Expression des  $\beta_2$ -Integrins CD11a auf transkriptioneller Ebene reguliert und damit in die Mikrogliaaktivierung kontrollierend eingreift. Dieser Signalweg schließt die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sowie dessen direkte Protein-Protein-Interaktion mit der aktivierten PARP-1 mit ein. Das nicht zu den Histonen gehörende, aber chromosomale Protein, HMG-1(Y) konnte als Interaktionspartner ermittelt werden und wurde bereits in anderen Arbeiten als Teilnehmer bei der NF- $\kappa$ B-Bindung und Transaktivierung des iNOS-Promotors identifiziert (PELLACANI et al., 1998; ZHANG & VERDINE, 1999). Da die PARP in die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkriptionsaktivierung involviert ist, und da die Expression der iNOS und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies allgemeine Zeichen einer Mikrogliaaktivierung darstellen, liegt es nahe, daß die PARP-1 eine eher allgemeine regulatorische Rolle in der Mikrogliaaktivierung einnimmt. Während jedoch viele Studien Signalwege der Integrinaktivierung durch eine Ligand-Integrin-

Interaktion beschrieben haben, oder durch eine Ligandenbindung an Nicht-Integrin Oberflächenmoleküle über Serin/Threonine-Phosphorylierungssignalwege (BUYON et al., 1990; VALMU et al., 1991), zeigt der hier dargestellte molekulare Signalweg der PARP-1-abhängigen Integrinexpression einen völlig neuen und unabhängigen Signalweg, der sich von den bisher bekannten Zell-Zell-Kommunikationen oder der Liganden-Bindung unterscheidet. Die Ergebnisse unterstützen weiterhin die These, daß eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Mikrogliazellen eher zur Bildung neurodegenerativer Faktoren führt (QUIN et al., 1998).

In der vorliegende Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß eine Inhibition der PARP-1-abhängigen CD11a-Expression Neurone vor einem Sekundärschaden schützt. Eine Inhibition der PARP-1 spezifisch in Mikrogliazellen bewirkte sogar, daß die Größe des Schadensgebietes in lebenden Hirnschnittkulturen drei Tage nach dem Transfer von asPARP-1 Mikrogliazellen unter die des Primärschadens reduziert wurde. Durch dieses Ergebnis liegt die Vermutung nahe, daß durch eine Inhibition der PARP-1 in Mikrogliazellen eher die destruktiven Eigenschaften als die protektiven Fähigkeiten der Zelle ausgeschaltet werden. Da die Aktivierung von Mikrogliazellen grundsätzlich nicht darauf ausgerichtet zu sein scheint, Zellen zu zerstören, sondern Zellen, die durch andere Einflüsse bereits geschädigt sind, zu entfernen und damit dem gesunden Gewebe regenerative Impulse zu geben (BANATI & GRAEBER, 1994), sezernieren die intrinsischen Gehirnmakrophagen neben entzündungsfördernden Produkten auch entzündungshemmende Substanzen und Wachstumsfaktoren, die eine entscheidende Rolle bei der Suppression der Immunantwort und der Wundheilung spielen (STREIT, 2002). Hierzu gehören Neurotrophine (NGF, NT3) und antiinflammatorische Zytokine wie beispielsweise TGF- $\beta$  und IL-10 (HANISCH, 2002). Diese Faktoren könnten durch eine Inhibition der PARP-1 eventuell unbeeinflusst bleiben und zu einer Regeneration initial geschädigter Neurone beitragen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die defekte CD11a-Expression dazu führt, die Fähigkeit von Mikrogliazellen spezifisch in das Schadensgebiet zu invadieren, komplett unterbindet.  $\beta_2$ -Integrine sind auch auf der Oberfläche peripherer Leukozyten lokalisiert und dort wichtig für die Zellmigration in Entzündungsgebiete (GAHMBERG et al., 1998). Die Expression von Adhäsionsmolekülen ist für Leukozyten auch von Bedeutung, um sich an Endothelzellen anzuhafte und dann in das verletzte Hirngewebe zu infiltrieren (KIM et al., 1995). In klinischen Studien konnte weiterhin gefunden werden, daß es auf Leukozyten von Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall zu einer vermehrten Expression des Integrins CD11a kommt (KIM et al., 1995). Unter vielen pathologischen Bedingungen wie beispielsweise nach einem ischämischen Schlaganfall, wirkt sich die Ansammlung inflammatorischer Zellen nachteilig für den Patienten aus. Maßnahmen, um die Einwanderung von Entzündungszellen in verletzte Gewebereiche zu verhindern, wären deshalb erstrebenswert. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten eine Erklärung für Beobachtungen darstellen, in denen gezeigt werden konnte, daß eine Inhibition der PARP-1 zu einer verzögerten Rekrutierung von Leukozyten (SZABÓ et al., 1997) und zu protektiven Effekten in peripheren Geweben führt, wie

beispielsweise nach einem Herzinfarkt (PIEPER et al., 2000; ZINGARELLI et al., 1997), da Mikrogliazellen nach ihrer Aktivierung viele Gemeinsamkeiten mit Gewebsmakrophagen aber auch mit neutrophilen Granulozyten aus der Körperperipherie aufweisen. In **Tabelle 5.1** sind die Effekte einer PARP-Inhibition auf periphere Leukozyten im Zusammenhang mit verschiedenen inflammatorischen Krankheitsmodellen dargestellt.

**Tabelle 5.1** Auswirkungen einer PARP-Inhibition auf periphere Leukozyten bei inflammatorischen Erkrankungen

Krankheitsmodell (Maus/Ratte)	Art der PARP-Inhibition	Effekte der PARP-Inhibition	Literaturhinweise
<b>Herzinfarkt</b>	PARP-/- Phänotyp 3-ABA GPI6150	<b>Verringerung</b> der Infarktgröße und <b>der Leukozyteneinwanderung sowie der zirkulierenden TNF-<math>\alpha</math> Konzentration und Reduktion der P-Selectin- und ICAM-1- Expression</b>	ZINGARELLI et al., 1998 YANG et al., 2000 LIAUDET et al., 2001 ZINGARELLI et al., 1997
<b>Ischämie/Reperfusionsschaden der Abdominalarterien</b>	3-ABA	Reduktion der epithelialen Hyperpermeabilität und <b>Verhinderung der Leukozytenrekrutierung</b> sowie Reduktion der reaktiven Peroxynitritbildung	CUZZOCREA et al., 1997
<b>Lungenödem</b>	3-ABA PARP-/- Phänotyp	Reduktion der Ödembildung, <b>Unterdrückung der Leukozyteneinwanderung</b> Reduktion der reaktiven Peroxynitritbildung	SZABO et al, 1997 CUZZOCREA et al, 1998
<b>Kolitis</b>	PARP-/- Phänotyp 3-ABA PJ34 GPI6150	Verkürzung des Krankheitsverlaufs, <b>reduzierte Leukozyteneinwanderung</b>	ZINGARELLI et al., 1999
<b>Uveitis</b>	PJ34	<b>Verhinderung der Leukozytenmigration in das Entzündungsgebiet</b>	MABLEY et al., 2001
<b>Hämorrhagischer Schock, Sepsis</b>	PARP-/- Phänotyp	Erhöhte Überlebensrate, <b>reduzierte Leukozyteneinwanderung</b>	LIAUDET et al., 2001 SORIANO et al., 2002

Durch die in dieser Arbeit und in anderen Forschungsarbeiten beschriebenen Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, daß die mikrogliale PARP-1 ein vielversprechendes Ziel für neuroprotektive Maßnahmen nach einem Primärereignis darstellt. In zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Studien konnte dazu gezeigt werden, daß eine Inhibition der PARP-1 einen Einfluß auf die Regulation, Expression und Aktivierung von Schlüsselgenen und Proteinen einer Entzündungsreaktion hat (LE PAGE et al.,

1998; NIRODI et al., 2001; HASKO et al., 2002). Durch die Möglichkeit, daß bestimmten Promotoren PARP-1-Bindungselemente fehlen, könnte erklärt werden, daß die Regulation der Transkription durch die PARP-1 dabei zell- und genspezifisch ist (HA et al., 2002). In tierexperimentellen Krankheitsmodellen des ZNS konnte gezeigt werden, daß die Inhibition der PARP-1 eine Hemmung der NMDA-Rezeptor vermittelten Glutamatoxizität bewirkt (ZHANG et al., 1994) und die NMDA-Toxizität weiterhin in kortikalen Neuronen von PARP<sup>-/-</sup> Mäusen praktisch aufgehoben ist. Dieser Effekt konnte auch durch die chemische Hemmung mit dem hochspezifischen PARP-Inhibitor DPQ erreicht werden (ZHANG et al., 1994). Ebenso zeigen PARP<sup>-/-</sup>-Mäuse eine stärkere Neuroprotektion als Tiere, die mit NMDA-Antagonisten oder NOS-Inhibitoren behandelt wurden (ELIASSON et al., 1997; TOKIME et al., 1998). PARP<sup>(-/-)</sup>-Mäuse weisen weiterhin eine stark verminderte NF-κB-Aktivität auf (OLIVER et al., 1999; HA et al., 2002), wobei die nukleäre Translokation von NF-κB zwar nach Stimulation unbeeinflusst, aber die Bindungsfähigkeit von NF-κB an entsprechende Zielgene, wie iNOS und NO, sehr stark reduziert ist (OLIVIER et al., 1999; HASSA & HOTTIGER, 1999). Hierzu konnte auch in Makrophagen beobachtet werden, daß eine Inhibition der Poly(ADPribose)ierung die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine verhindert und die NF-κB-Aktivierung verzögert (LE PAGE et al., 1998). Da NF-κB eine wichtige Rolle bei der Produktion inflammatorischer Gene nach einer neuronalen Schädigung spielt und an der Gliazellaktivierung und der damit verbundenen Zytotoxizität erheblich beteiligt ist (COMBS et al., 2001; NGUYEN et al., 2002), könnte die Inhibition der PARP-1 ein potientes Ziel darstellen, um unter anderem die NF-κB-abhängigen, proinflammatorischen Signalwege in Mikrogliazellen zu hemmen.

### **5.3 Die mikrogliale PARP-1-Hemmung als therapeutische Option**

In der vorliegenden Arbeit konnte durch funktionelle und mechanistische Untersuchungen ein neuer Aktivierungsmechanismus in Mikrogliazellen identifiziert werden. Dieser beinhaltet den Signalweg von der PARP-1 im Zellkern der Mikrogliazelle bis zur Kontrolle der Migration zum Ort der Neurodegeneration. Damit wurde zum einen ein grundsätzlich neues Regulationsprinzip der Integrin-Expression beschrieben und zum anderen ein molekulares Zielprotein identifiziert, an dem neue therapeutische Strategien zur Neuroprotektion ansetzen können.

Mit dem Ansatz einer PARP-1 Hemmung als therapeutische Intervention nach einer exzitotoxischen Schädigung haben sich viele Wissenschaftler beschäftigt. Während sich jedoch bereits veröffentlichte Arbeiten auf die Hemmung der neuronalen PARP-1 konzentrieren (ELIASSON et al., 1997; ZHANG et al., 1994), um den nach einer Schädigung auftretenden NAD<sup>+</sup>- und ATP-Verbrauch (HA & SNYDER, 2000), der letztendlich zum Zelltod führt, zu inhibieren, wurde in dieser Arbeit die mikrogliale PARP-1 gehemmt. Der entscheidende Unterschied lag somit in der zellspezifischen mikroglialen Hemmung, mit der letztendlich ein effektiver Schutz vor einer neuronalen Sekundärschädigung erzielt werden

konnte. Aufgrund der wesentlichen Beteiligung der PARP-1 an der mikroglialen Migration könnte die Hemmung der PARP-1 in aktivierten Mikrogliazellen als Möglichkeit einer Therapie neurologischer Erkrankungen angesehen werden. Denn gerade bei neuropathologischen Ereignissen, in denen der Mikroglia eine destruktive Funktion zukommt, wären therapeutische Eingriffe in sekundäre Schadensprozesse sinnvoll, da vor allem diese Sekundärschäden für die Entstehung des Krankheitsbildes durch die Ausfälle von Hirnbereichen verantwortlich sind.

PARP-Inhibitoren sind in der Lage, bei einer zerebralen Ischämie, sowohl die Aktivierung der PARP als auch den darauffolgenden starken Energieverlust der Zelle zu unterbinden (PLASCHKE et al., 2000). Damit erscheint die Anwendung von PARP-Inhibitoren zunächst als eine vielversprechende Therapie, um einem neuronalen Zelltod durch exzitotoxische Schädigung oder Ischämie vorzubeugen. Eine Inhibition der PARP bringt aber nicht nur Vorteile mit sich. So zeigen beispielsweise PARP<sup>-/-</sup>-Tiere eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber alkylierenden Agenzien und radioaktiver Strahlung (VIRAG & SZABÓ, 2002). Eine Langzeitinhibition der PARP könnte auch beim Menschen zu einer genomischen Instabilität führen, da die PARP-1 an der schnellen und effizienten DNA-Reparatur beteiligt ist. Die PARP-1 ist ebenfalls in Neuronen als Reparaturenzym tätig (DANTZER et al, 1999) und stellt einen essentiellen Schutzmechanismus dar, der es Neuronen ermöglicht, mit Streßfaktoren, wie beispielsweise freien Radikalen, umzugehen (COLTON & GILBERT, 1993). Deshalb erweist sich auch hier die systemische PARP-1-Hemmung als kritisch. Eine Therapie mit systemischen PARP-1-Inhibitoren sollte deshalb möglichst früh nach dem Initialereignis begonnen werden, da damit der akute neuronale Zelltod verhindert werden könnte. Zu einem späteren Zeitpunkt könnte eine Hemmung der neuronalen PARP-1 dazu führen, einen weiteren neuronalen Schaden zu induzieren, da das Reparatursystem gehemmt werden würde. Vor allem im Randgebiet des Infarktes, der Penumbra, sind ischämische Veränderungen möglicherweise reversibel (PESTALOZZA et al., 2002). Deshalb sollten initial überlebende Neurone aus diesem Randgebiet mit therapeutischen Interventionen gerettet werden, um das Infarktgebiet einzugrenzen. Große Mengen aktivierter Mikrogliazellen werden in der Penumbra, dem Areal initial überlebender Neurone nach einem ischämischen Insult, in den Stunden bis Tage nach dem Primärereignis weitere Neurone untergehen, gefunden (MABUCHI et al., 2000). Da Veränderungen der Ionenhomöostase und der Neurotransmitterausschüttung minutenschnell ablaufen, entzündliche Veränderungen und apoptotische Prozesse im Bereich von Stunden und Tagen stattfinden, sollten therapeutische Präventionen sich auf die Hemmung von Faktoren konzentrieren, die bei der Entstehung des sekundären Schadens eine Rolle spielen. Hierzu zählen unter anderem die Inhibition der Migration von Mikrogliazellen und Makrophagen zum Ort des neuronalen Schadens und die Verhinderung der Produktion toxischer Radikale und proinflammatorischer Zytokine durch eben diese Zellen.

Da die PARP-1 im Gegensatz zu ruhenden Mikrogliazellen in aktivierten stark erhöht ist und zudem auch noch ihre Migration kontrolliert, könnte sich die Hemmung der PARP-1 spezifisch nur auf die aktivierten Zellen schädlich auswirken. Zusätzlich konnte beobachtet werden, daß durch antisense

PARP-1-defiziente Mikrogliazellen im lebenden Hirngewebe der neuronale Schaden unter den des Primärschadens reduziert wird, was auf eine unbeeinflusste Produktion, Sekretion und Wirksamkeit protektiver Faktoren wie Zytokinen zurückzuführen scheint.

Es ist denkbar, daß die Aktivierungssignale bei akuten Verletzungen, wie beispielsweise beim exzitotoxischen Zelltod im Rahmen eines Hirninfarktes, anderer Natur sind, als die, mit denen Mikrogliazellen zu Beginn von chronischen Neurodegenerationen konfrontiert werden. Das legt konsequenterweise auch die Aktivierung verschiedener Rezeptormechanismen und die Auslösung von Mikrogliareaktionen nahe, die spezifisch für die Art der Verletzung oder für die Erkrankung sind. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, die auf Untersuchungen an einem Läsionsmodell nach exzitotoxischer Schädigung in lebendem Hirngewebe beruhen, liegt der Ansatz jedoch nahe, daß auf eine neuronale Inhibition der PARP-1 in der akuten Phase des primären exzitotoxischen Ereignisses (ELIASSON et al., 1997; ZHANG et al., 1994; HA & SNYDER, 2000) eine spezifische Inhibierung der PARP-1 in Mikrogliazellen erfolgen sollte, um einen Sekundärschaden zu verhindern und die bestmögliche Neuroprotektion zu erreichen. Sollten die hier für Mikrogliazellen beschriebenen Mechanismen auch auf periphere Leukozyten zutreffen und auch in diesen Zellen die PARP-1 entscheidend an der Regulation der Migration zum Ort der Gewebsschädigung beteiligt sein, worauf es einige Hinweise gibt, dann könnte die zellspezifische PARP-1-Hemmung zur Entwicklung neuer hochpotenter antiinflammatorischer Medikamente führen.